

Deteksi *Megalocytivirus*
Bagian 1 : Metode *quantitative (real-time)*
***polymerase chain reaction (qPCR)* menggunakan**
hydrolysis probe



© BSN 2016

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar Isi

Prakata	ii
Pendahuluan.....	iii
1 Ruang Lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip umum.....	3
4 Peralatan	3
5 Bahan	3
6 Prosedur	4
7 Interpretasi hasil	5
8 Jaminan mutu pengujian	8
Tabel 1 - Komposisi koktail qPCR	5
Tabel 2 - Program amplifikasi	5
Tabel 3 - Keterangan gambar kurva standar hasil amplifikasi <i>real-time</i>	7
Tabel 4 - Contoh keterangan gambar pengujian contoh uji hasil amplifikasi <i>real-time</i>	8
Gambar 1 – Kurva standar	6
Gambar 2 - Contoh kurva pengujian contoh uji	7
Lampiran A (Normatif)_Sekuen primer, <i>probe</i> dan fragmen standar untuk deteksi <i>Megalocytivirus</i>	9
Bibliografi	10

Prakata

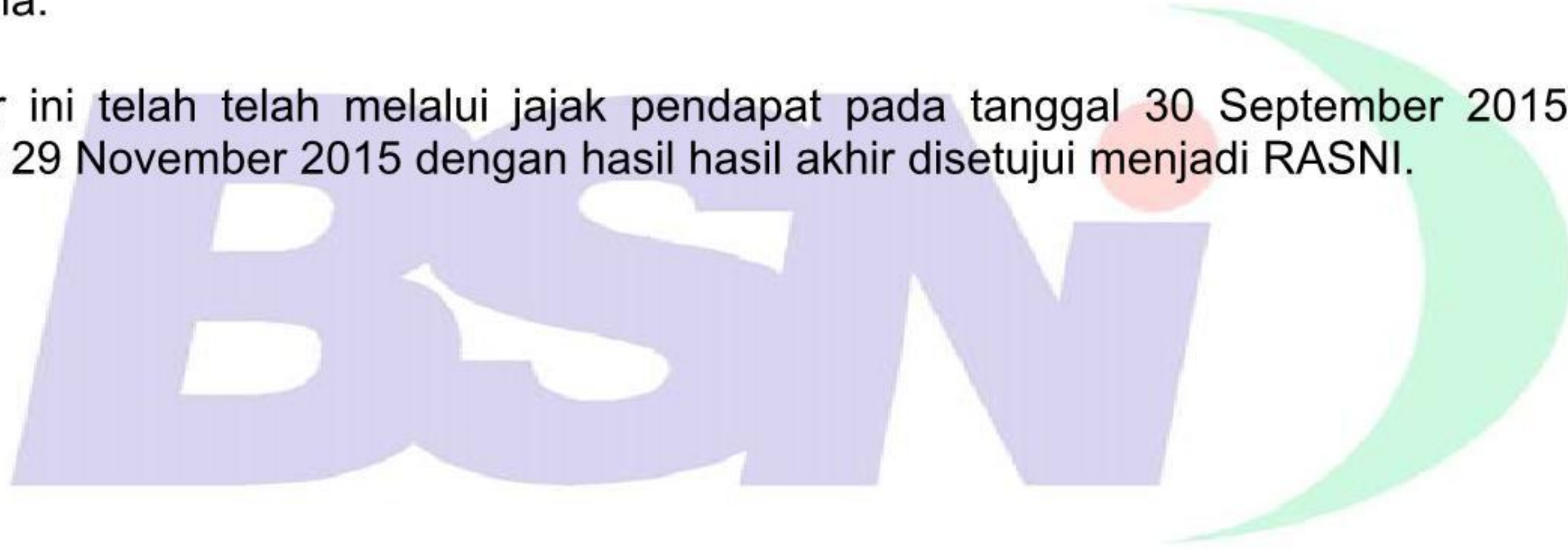
Standar deteksi *Megalocytivirus* - Bagian 1: Metode quantitative (real-time) *polymerase chain reaction* (qPCR) menggunakan *hydrolysis probe* ini menetapkan metode uji untuk mendeteksi *Megalocytivirus*, sebagai upaya pencegahan penyebaran penyakit hama dan penyakit ikan/hama penyakit ikan karantina (HPI/HPIK)

Standar ini merupakan rangkaian dari standar seri deteksi *Megalocytivirus* yang memberikan beberapa alternatif metode uji sesuai dengan tingkat teknologi pada masing-masing laboratorium uji.

Standar ini dirumuskan oleh Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya dan telah pada konsensus pada tanggal 6 Agustus 2015 di Tangerang Selatan, yang dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-07, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya.

Untuk menghindari kesalahan dalam menggunakan dokumen ini, disarankan bagi pengguna standar untuk menggunakan dokumen SNI yang dicetak dengan menggunakan tinta berwarna.

Standar ini telah melalui jajak pendapat pada tanggal 30 September 2015 sampai dengan 29 November 2015 dengan hasil akhir disetujui menjadi RASNI.



Pendahuluan

Peraturan yang dijadikan rujukan di dalam penyusunan standar ini adalah :

1. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan;
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan;
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan;
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia;
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa;
6. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. 26/Kepmen-KP/2013 tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Golongan, Media Pembawa dan Penyebarannya.



Deteksi *Megalocytivirus*
Bagian 1: Metode *quantitative (real-time)* polymerase chain reaction (qPCR)
menggunakan hydrolysis probe

1 Ruang Lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Megalocytivirus* yang meliputi *red sea bream iridovirus* (RSIV), *infectious spleen and kidney necrosis virus* (ISKNV), *dwarf gouramy iridovirus* (DGIV) dengan metode *quantitative (real-time) polymerase chain reaction* (qPCR) menggunakan *hydrolysis probe*.

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan

2.1

alikuot

pembagian menjadi beberapa ukuran volume yang lebih kecil agar memudahkan pemakaian dan mencegah dari kemungkinan kontaminasi

2.2

amplifikasi

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro*

2.3

annealing

proses penempelan primer pada sekuen DNA untai tunggal yang komplementer

2.4

Ct (*cycle threshold*)

titik perpotongan antara kurva amplifikasi kontrol negatif dengan contoh uji atau titik awal terjadinya kenaikan kurva amplifikasi bisa juga disebut sebagai Cq (*cycle quantification*)/ Cp (*crossing point*)

2.5

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

2.6

ekstensi

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA *polymerase*, sehingga akan terbentuk DNA untai ganda

2.7

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik dari jaringan atau sel

2.8**hydrolysis probe**

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang dilabel dengan *fluorophore* secara kovalen pada ujung 5' dan *quencher* pada ujung 3' yang akan berpendar ketika terjadi proses amplifikasi. *Hydrolysis probe* yang digunakan adalah *TaqMan probe*.

2.9**koktail**

mastermix ditambah DNA *template*

2.10**kurva standar**

kurva yang dibuat dari sederetan larutan standar yang masih dalam batas linieritas sehingga dapat diregresilinierkan

2.11**kontrol negatif amplifikasi/negative amplification control (NAC)/ no template control (NTC)**

kendali hasil reaksi PCR dengan menggunakan *template* berupa DDW yang diperlakukan sama dengan hasil ekstraksi contoh uji untuk mengetahui terjadinya suatu kontaminasi dari dalam pada pelaksanaan qPCR

2.12**kontrol negatif ekstraksi/negative extraction control (NEC)**

hasil ekstraksi yang berasal dari DDW sebagai pengganti contoh uji

2.13**kontrol positif ekstraksi/positive extraction control (PEC)**

hasil ekstraksi yang berasal dari organ yang terinfeksi

2.14**limit of detection (LoD)**

jumlah *copy* atau molekul target terendah yang masih dapat dideteksi dengan tingkat kepercayaan 95 %

2.15**mastermix**

campuran yang terdiri dari DNA polymerase, primer, probe, dNTPs, *buffer* dan DDW

2.16**primer**

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.17**real-time PCR**

suatu teknik PCR dengan metode analisis yang secara simultan dapat diamati hasil amplifikasinya

2.18**standar positif**

plasmid yang mengandung potongan DNA virus yang diketahui jumlah *copy*-nya

2.19

template

sekuen DNA tertentu yang akan diamplifikasi

2.20

Taqman probe

probe hidrolisis yang dirancang untuk meningkatkan spesifisitas PCR kuantitatif.

3 Prinsip umum

Mengekstraksi dan memurnikan DNA dari contoh uji yang diduga terinfeksi *Megalocytivirus*, dilanjutkan amplifikasi yang berlangsung dalam satu tahap secara *real-time*.

4 Peralatan

- a) pengukur konsentrasi DNA berbasis spektrofotometri UV;
- b) *freezer* (-20 °C atau lebih rendah);
- c) *heating block* atau *waterbath*;
- d) *laminar air flow*;
- e) mesin *real-time* PCR;
- f) *minimixer*.
- g) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl; peralatan bedah terdiri dari: pinset, gunting, dan pisau bedah; rak *ice block*;
- h) sentrifus;
- i) mini-sentrifus;
- j) peralatan gelas;
- k) timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg;

5 Bahan

- a) *tris* EDTA (TE) *buffer* (10 mM *tris* HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5);
- b) *nuclease-free water/ double distilled water* (DDW);
- c) etanol p.a;
- d) *filtered microtip* berbagai ukuran 10 µl – 1 000 µl ;
- e) isopropanol (2-propanol);
- f) kloroform;
- g) *kit real-time* PCR komersial kompatibel dengan *TaqMan[®] probe*;
- h) larutan ekstraksi DNA komersial;
- i) larutan penghambat *DNase*;
- j) masker;
- k) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- l) plasmid standar positif *Megalocytivirus*;
- m) sarung tangan (*powder-free*);
- n) 1 set primer dan *probe* (AAHL-CSIRO, 2013);
 Primer RSIV RT F: 5'-TGACCAGCGAGTTCCTTGACTT-3'
 Primer RSIV RT R: 5'-CATAGTCTGACCGTTGGTGATACC-3'
 RSIV *probe* : 5'-**6FAM** AAC GCCTGCATGATGCCTGGC **TAMRA**-3'
- o) tabung mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml;
- p) tabung atau *microplate* PCR optikal ukuran 0,1 ml - 0,2 ml atau tabung kapiler ukuran 20 µl - 100 µl.

CATATAN Bahan disesuaikan dengan metode standar yang digunakan

6 Prosedur

6.1 Persiapan contoh uji

- Ikan ukuran kecil (kurang dari 1 cm)
ambil contoh uji secara utuh;
- Ikan ukuran sedang (ukuran 1 cm – 6 cm)
ambil contoh uji dari insang, hati dan limpa;
- Ikan ukuran besar (ukuran lebih dari 6 cm)
ambil contoh uji dapat dari insang, hati dan limpa baik segar maupun beku (-20°C) atau yang sudah diawetkan dalam larutan preservatif DNA.

6.2 Ekstraksi DNA dengan metode presipitasi

- masukkan 20 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- tambahkan 600 µl larutan kit ekstraksi DNA komersial *dodecyl trimethylammonium bromide* (DTAB), homogenkan menggunakan penggerus pelet;
- Inkubasikan pada 75 °C selama 5 menit dan dinginkan pada 25 °C.
- tambahkan 700 µl kloroform.;
- tutup tabung mikro dan kocok dengan *minimixer* selama 20 detik;
- sentrifugasi contoh uji pada 12 000 x g selama 5 menit;
- pindahkan 200 µl cairan lapisan paling atas ke dalam tabung mikro baru;
- tambahkan larutan kit ekstraksi *cetyl trimethylammonium bromide* (CTAB) sebanyak 100 µl dan DDW sebanyak 900 µl;
- kocok dengan *minimixer* dan inkubasikan pada 75 °C selama 5 menit;
- sentrifugasi pada 12 000 x g selama 5 menit, pindahkan cairan bening ke dalam tabung mikro baru yang berisi 300 µl etanol 95 %;
- homogenkan dengan *minimixer*;
- sentrifugasi pada 12 000 x g selama 5 menit;
- uang supernatan, cuci pelet dengan 200 µL etanol 75 %, sentrifugasi pada 7 500 x g selama 2 menit;
- keringanginkan pelet DNA, larutkan pelet DNA dengan DDW atau bufer TE;
- simpan larutan DNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada *freezer* dengan suhu yang lebih rendah (<-40 °C) dalam bentuk alikuot.

CATATAN Prosedur metode ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan

6.3 Pengukuran konsentrasi DNA

- ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi DNA pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi DNA dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

A_{260} adalah nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280});
- simpan larutan DNA pada -20 °C apabila tidak langsung digunakan.

CATATAN Prosedur pengukuran DNA disesuaikan dengan alat yang digunakan

6.4 Amplifikasi

- cairkan DNA *template*, QuantiTect 2x PCR MasterMix™, primer, *probe*, DDW dengan meletakkan di atas rak *ice block*;
- buat preparasi *mastermix* sesuai dengan Tabel 1. Siapkan volume *mastermix* $n+10\%$, (n = jumlah reaksi) lebih banyak dari yang dibutuhkan. Contoh uji minimal dianalisis secara duplo;
- homogenkan semua bahan *mastermix* dan distribusikan ke masing-masing tabung/*plate* PCR optikal;
- masukkan 2 μ l *template* DNA (10 ng - 100 ng) contoh uji, kontrol positif ekstraksi; kontrol negatif ekstraksi, kontrol positif amplifikasi (DNA); kontrol negatif amplifikasi (NTC); dan 4 standar positif (10 *copies*; 10² *copies*; 10³ *copies*; 10⁴ *copies*).
- lakukan amplifikasi dengan real time PCR, dengan kondisi sesuai Tabel 2.

CATATAN 1 Seluruh proses preparasi reagen dilakukan pada kondisi dingin.

CATATAN 2 Prosedur metode amplifikasi disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan.

CATATAN 3 Untuk kebutuhan diagnosis cepat dapat menggunakan kontrol positif amplifikasi (DNA), 4 standar positif (10 *copies*; 10² *copies*; 10³ *copies*; 10⁴ *copies*) dan kontrol negatif amplifikasi (NTC).

Tabel 1 - Komposisi koktail qPCR

No.	Komponen	Volume/reaksi (μ l)	Konsentrasi akhir
1.	QuantiTect 2x PCR Master Mix™	12,5	1 x
2.	Primer forward (20 μ M)	0,5	0,4 μ M
3.	Primer reverse (20 μ M)	0,5	0,4 μ M
4.	Probe (10 μ M)	0,5	0,2 μ M
5.	DDW	9	-
6.	DNA <i>template</i>	2	10 ng-100 ng
	Total Volume	25	

CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi

Tabel 2 - Program amplifikasi

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Enzyme activation	50	2 menit	1
PCR initial activation	95	15 menit	1
Denaturasi	95	15 detik	40
Annealing/extention	60	60 detik	

CATATAN Profil amplifikasi disesuaikan dengan manual kit dan mesin *real-time* PCR yang digunakan

7 Interpretasi hasil

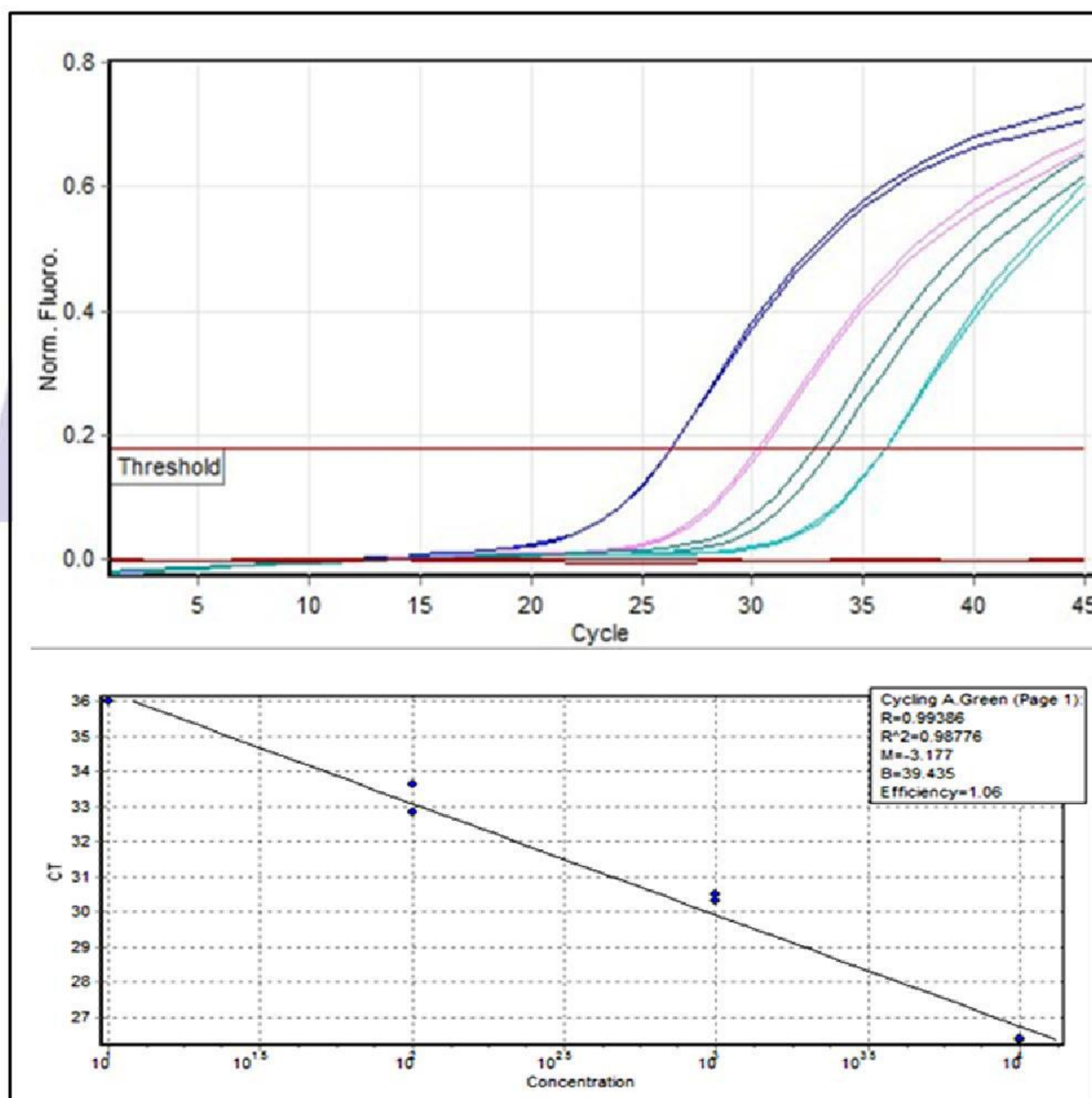
Analisis data sesuai dengan *software real-time* PCR yang digunakan.

- Pengamatan setelah analisis data amplifikasi:
Interpretasi kurva amplifikasi adalah sebagai berikut:

- contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat naiknya kurva di atas garis *threshold/cut off* dan nilai Ct lebih kecil atau sama dengan LoD;
- semakin cepat naik/munculnya kurva dan memotong garis *threshold* menunjukkan jumlah *copy* DNA virus yang semakin banyak (konsentrasinya tinggi);
- contoh uji dinyatakan negatif apabila berada dibawah garis *threshold* dan nilai Ct lebih besar dari LoD dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95 %.

b) Kuantifikasi *copy* virus

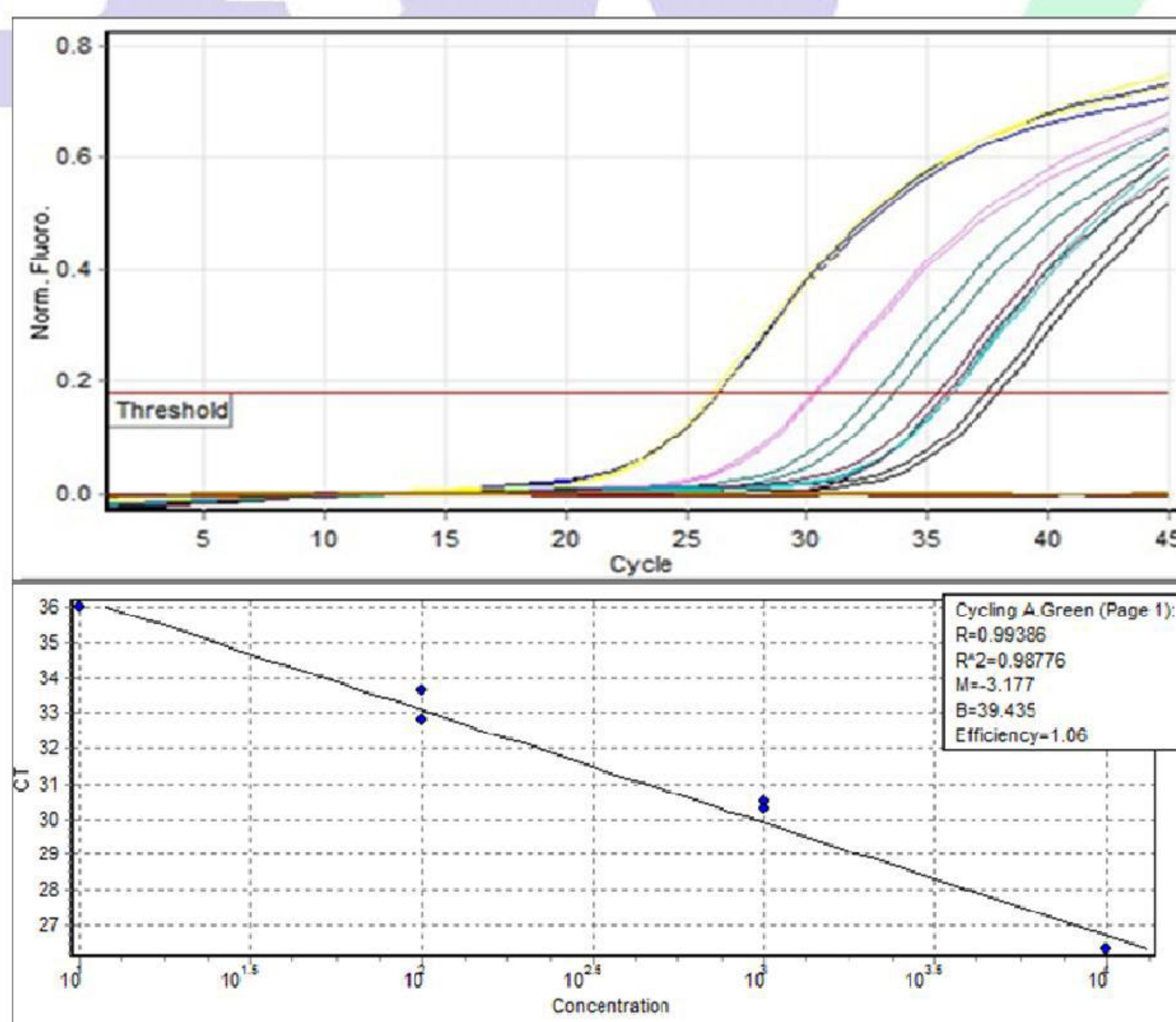
- jumlah *copy* virus dapat dilihat pada tabel laporan kuantifikasi di perangkat lunak komputer yang terhubung dengan mesin *real-time* PCR yang digunakan;
- kurva standar disajikan pada Gambar 1 dan Tabel 3;
- berdasarkan Tabel 4 hasil pengujian dapat dianalisis sebagai berikut :
 - 1) contoh uji dinyatakan positif apabila konsentrasi sama atau lebih dari nilai LoD 10 *copies* (B1 dan B2, C1 dan C2);
 - 2) contoh uji dinyatakan negatif apabila nilai konsentrasi kurang dari nilai LoD 10 *copies* (A1 dan A2,)



Gambar 1 – Kurva standar

Tabel 3 - Keterangan gambar kurva standar hasil amplifikasi *real-time*

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given conc (copies/ul)	Calc conc (copies/ul)	% Var
1	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ⁴ (1)	Standard	26.34	10,000.0	13,206.3	32.1
2	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ⁴ (2)	Standard	26.37	10,000.0	12,970.7	29.7
3	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ³ (1)	Standard	30.48	1,000.0	655.8	34.4
4	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ³ (2)	Standard	30.30	1,000.0	748.9	25.1
5	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ² (1)	Standard	33.61	100.0	68.1	31.9
6	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ² (2)	Standard	32.82	100.0	121.0	21.0
7	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ¹ (1)	Standard	36.01	10.0	12.0	20.0
8	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ¹ (2)	Standard	36.00	10.0	12.0	20.1
9	■	Sampel negatif amplifikasi (1)	NTC				
10	■	Sampel negatif amplifikasi (2)	NTC				

**Gambar 2 - Contoh kurva pengujian contoh uji**

Tabel 4 - Contoh keterangan gambar pengujian contoh uji hasil amplifikasi *real-time*

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given conc (copies/ul)	Calc conc (copies/ul)	% Var
1	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ⁴ (1)	Standard	26.34	10,000.0	13,206.3	32.1
2	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ⁴ (2)	Standard	26.37	10,000.0	12,970.7	29.7
3	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ³ (1)	Standard	30.48	1,000.0	655.8	34.4
4	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ³ (2)	Standard	30.30	1,000.0	748.9	25.1
5	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ² (1)	Standard	33.61	100.0	68.1	31.9
6	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ² (2)	Standard	32.82	100.0	121.0	21.0
7	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ¹ (1)	Standard	36.01	10.0	12.0	20.0
8	■	Standar <i>Megalocytivirus</i> 10 ¹ (2)	Standard	36.00	10.0	12.0	20.1
9	■	Contoh Uji A (1)	Unknown	37.48		4.1	
10	■	Contoh Uji A (2)	Unknown	37.96		2.9	
11	■	Contoh Uji B (1)	Unknown	35.41		18.5	
12	■	Contoh Uji B (2)	Unknown	35.79		14.0	
13	■	Contoh Uji C (1)	Unknown	26.44		12,284.3	
14	■	Contoh Uji C (2)	Unknown	26.11		15,646.6	
15	■	Sampel negatif amplifikasi (1)	NTC				
16	■	Sampel negatif amplifikasi (2)	NTC				
17	■	Sampel negatif ekstraksi (1)	NEC				
18	■	Sampel negatif ekstraksi (2)	NEC				

8 Jaminan mutu pengujian

- proses ekstraksi DNA dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif ekstraksi (*positive extraction control*, PEC) dan kontrol negatif ekstraksi (NEC) dan menunjukkan hasil yang konsisten atau dengan menggunakan *reference gene*;
- hasil ekstraksi DNA mempunyai rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,8 – 2,1;
- proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif amplifikasi (*positive amplification control*, PAC) dan kontrol negatif amplifikasi (NAC) menunjukkan hasil yang konsisten;
- efisiensi amplifikasi dinyatakan baik apabila mempunyai nilai 0,9 – 1,1;
- proses *real-time* PCR valid bila dilihat dari kurva standar dengan nilai koefisien determinasi (R^2) > 0,95;
- keterulangan (*repeatability*) untuk pengujian duplo harus mempunyai nilai standar deviasi (SD) Ct lebih kecil dari 0,5.

CATATAN Jika ditampilkan sebagai persentase variabilitas (% Var), maka pengujian duplo harus mempunyai nilai SD Cq lebih kecil dari 50 %.

Lampiran A (Normatif)
Sekuen primer, *probe* dan fragmen standar untuk deteksi *Megalocytivirus*

**Infectious spleen kidney necrosis virus (ISKNV), MCP gene
(Accession no. KC.775381.1)**

Primer dan probe *real-time* PCR (qPCR) *Megalocytivirus* TaqMan probe (AAHL-CSIRO, 2013)

Primer RSIV RT F: 5'-TGACCAGCGAGTTCCTTGACTT-3'

Primer RSIV RT R: 5'-CATAGTCTGACCGTTGGTGATACC-3'

RSIV *probe*: 5'-6FAM AAC GCCTGCATGATGCCTGGC TAMRA-3'

TGACCAGCGAGTTCCTTGACTTTTGGAAACGCCTGC ATGATGCCTGGCAGC

Primer RSIV RTF

RSIV probe

AAACAATCTGGCTACAACAAGATGATTGGCATGCGCAGCGACCTGGTGGG
CGGTATCACCAACGGTCAGACTATG

Primer RSIV RT R

CATATAN Standar positif dapat berasal dari sekuen gen DNA *Megalocytivirus* yang kompatibel dengan primer dan probe yang digunakan.

Bibliografi

- [1] *Australian Animal Health Laboratory (AAHL)-CSIRO, 2013.CSIRO Megalocytivirus qPCR assay details dalam Megalocytivirus positive control information sheet*
- [2] *OIE., 2012. Manual of diagnostic tests for aquatic animals chapter 2.3.7. Red Sea Bream Iridoviral Disease.*

